

University of Groningen

Structural changes that accompany the self-assembly of hydrophobins

Vocht, Marcel Leo de

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2001

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Vocht, M. L. D. (2001). *Structural changes that accompany the self-assembly of hydrophobins*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

De meeste schimmels groeien in lange draadvormige structuren die schimmeldraden of hyphen genoemd worden. Deze hyphen scheiden aan hun uiteinden zogenaamde hydrofobines uit. Deze klasse eiwitten speelt een belangrijke rol in de groei en ontwikkeling van schimmels. De belangrijkste eigenschap van hydrofobines is dat ze een onoplosbare film kunnen vormen. De vorming van deze film wordt zelf-assemblage genoemd en is het onderwerp van dit proefschrift.

Hydrofobines assembleren alleen aan grensvlakken. In de natuur kan dit grensvlak het oppervlak van een plant zijn, maar ook het water - lucht grensvlak. Tijdens de assemblage richten de waterminnende (hydrofiele) groepen in het eiwit zich naar het water en de watermijdende (hydrofobe) groepen zich van het water af. Op deze manier wordt een zogenaamde amfipathische laag gevormd. Bij de meeste hydrofobines bestaat de film uit staafjes (rodlets) met een diameter van 10 nanometer.

De hydrofobinefilm kan verschillende functies hebben, afhankelijk van de plaats waar hij zich bevindt. Ten eerste zorgt een hydrofobinefilm voor de hechting van de schimmel aan andere organismen. Hierbij binden de hydrofobe groepen aan het waterafstotende oppervlak van bijvoorbeeld een plantenblad en de hydrofiele groepen binden aan de celwand van de schimmel. Een tweede functie vervult de hydrofobinefilm als coating op paddestoelen, waar het een waterafstotende laag vormt. Deze laag voorkomt dat (regen)water in de luchtkanalen trekt. Tenslotte worden sommige hydrofobines uitgescheiden in hun omgeving, waarna ze diffunderen naar het water – lucht grensvlak, waar ze een onoplosbare film vormen. Dit heeft tot gevolg dat de schimmeldraden die in het water groeien, uit het water kunnen ontsnappen, waarna paddestoelen gevormd kunnen worden. Zonder hydrofobinefilm zou de hoge oppervlaktespanning van water dit proces verhinderen.

Hydrofobines zijn niet alleen interessant vanwege hun rol in de ontwikkeling van schimmels, maar ze hebben ook medische en technologische toepassingsmogelijkheden. Na coating van medische implantaten met een laag hydrofobines worden de oppervlakken hydrofiel, waardoor lichaamcellen beter kunnen hechten. Ook kunnen hydrofobines gebruikt worden om andere moleculen aan het oppervlak van een biosensor te hechten. Tenslotte zou de eigenschap om 10 nanometer brede staafjes te vormen kunnen worden gebruikt in de nanotechnologie.

De structuur van de hydrofobines en de structuurveranderingen tijdens het assemblageproces zijn de onderwerpen van dit proefschrift. Over de hydrofobine SC3, die geproduceerd wordt door het waaiertje (*Schizophyllum commune*) is het meeste bekend en bovendien is deze eenvoudig in grote hoeveelheden te zuiveren. SC3 is daarom als modelhydrofobine gekozen. Andere hydrofobines blijken echter vergelijkbare eigenschappen te hebben.

In hoofdstuk 2 is beschreven dat SC3, behalve 112 aminozuren, ook 16 tot 22 suikergroepen bevat. Slechts twee van de ongeveer dertig bekende hydrofobines bevatten suikergroepen, die waarschijnlijk gebonden zijn aan het eerste, zogenaamde N-terminale, deel van het eiwit. De functie van de suikergroepen is niet bekend, maar wanneer ze worden verwijderd, verliest SC3 de mogelijkheid om te assembleren. Wanneer het suikerbevattende deel echter in zijn geheel wordt verwijderd (inclusief de aminozuren) behoudt SC3 de mogelijkheid te assembleren.

De structuurveranderingen van SC3 tijdens de assemblage is bestudeerd met circulair dichroïsme en infraroodspectroscopie en de resultaten staan beschreven in hoofdstuk 2 en 3 van dit proefschrift. Met deze technieken kan de vorm van het eiwit tijdens de assemblage gevolgd worden en zijn er drie verschillende toestanden in de assemblage van SC3 gevonden. Na oplossen in water bevindt SC3 zich in de zogenaamde monomere toestand (1). Er is verder weinig bekend over dit monomere SC3, omdat het eiwit bij hoge concentratie samenklontert, waardoor het onmogelijk is door röntgendiffractie aan kristallen, of NMR-spectroscopie hoge resolutie structuurinformatie te verkrijgen. Na interactie met een waterafstotend vast oppervlak, verandert 10% van het eiwit in α -helix. Deze toestand wordt dan ook de α -helixtoestand (2) genoemd. Aan het water – lucht grensvlak is deze toestand ook gevonden, maar hij is daar slechts enkele minuten aanwezig, omdat spontaan de vorm van het eiwit overgaat naar de β -sheettoestand (3). Deze toestand wordt zo genoemd, omdat 65% van het eiwit zich nu in β -sheets bevindt. Op een hydrofoob vast oppervlak, zoals plastic, kan SC3 ook overgaan van de α -helix naar de β -sheettoestand, maar alleen nadat bij hoge temperatuur zeep wordt toegevoegd. De α -helixtoestand blijkt dus een tussenvorm te zijn in het assemblageproces, die gevangen wordt op vaste oppervlak. De α -helix zou kunnen werken als een sensor voor grensvlakken, waardoor assemblage in oplossing voorkomen wordt (waar de α -helixtoestand niet bestaat). De vorming van de α -helixtoestand lijkt een trigger te zijn voor assemblage in de β -sheettoestand.

De assemblage aan het water - lucht grensvlak is ook bestudeerd met behulp van elektronenmicroscopie (zie hoofdstuk 3). Deze techniek liet zien dat de film die gevormd wordt door SC3 in de β -sheettoestand in eerste instantie amorf is (β -sheet1-toestand), maar na ongeveer een uur overgaat in de rodletstructuur (β -sheet2-toestand).

Alle hydrofobines bevatten acht cysteïneresiduen op dezelfde positie in het eiwit, die verknoopt zijn middels vier zwavelbruggen. De functie van deze zwavelbruggen staat beschreven in hoofdstuk 4. Na opening van de zwavelbruggen blijkt SC3 spontaan te assembleren in oplossing, nog voordat er interactie is met een grensvlak. Deze voortijdige assemblage zou erg schadelijk zijn voor de schimmel en wordt dus voorkomen door de aanwezigheid van de zwavelbruggen. Dit verklaart wellicht waarom de zwavelbruggen in alle hydrofobines worden gevonden. Wanneer bij het openen van de zwavelbruggen tegelijkertijd acht negatieve ladingen in het eiwit worden aangebracht, assembleert SC3 niet meer spontaan in oplossing, maar nog wel aan een grensvlak. Dit laat zien dat SC3

een zeer sterke neiging tot assemblage heeft aan grensvlakken, die niet afhangt van aanwezigheid van de zwavelbruggen en zelfs de afstotende interactie tussen gelijkgeladen groepen kan overwinnen.

De structuur van de rodlets is ook bestudeerd met behulp van Atomic Force Microscopy (hoofdstuk 2 en 5). Bij deze techniek wordt een oppervlak afgetast met een zeer scherpe naald, waarbij een beeld van het oppervlak ontstaat. Deze techniek laat zien dat de rodlets van SC3 zijn opgebouwd uit vier tot zes protofilamenten met ieder een diameter van twee tot drie nanometer.

Uit de literatuur blijkt dat er een klasse eiwittenfibrillen is met een vergelijkbare opbouw. In het algemeen vouwen de meeste eiwitten zich in een goed gedefinieerde structuur, waardoor ze specifieke functies vervullen in de cel. Onder bepaalde, niet natuurlijke, omstandigheden (bijvoorbeeld hoge temperatuur) kan deze structuur ontvouwen en overgaan in fibrillen, die rijk zijn aan β -sheet structuur, waarbij het de functie verliest. Dit proces kan erg schadelijk zijn, niet alleen omdat het eiwit de functie verliest, maar ook omdat de fibrillen andere cellulaire processen kunnen verstoren. Deze fibrillen worden amyloidfibrillen genoemd en lijken een rol te spelen bij een groot aantal ziektes, zoals Alzheimer en de ziekte van Jakob-Creutzfeld.

Om te onderzoeken of SC3 rodlets hetzelfde zijn als deze amyloidfibrillen, zijn aan het geassembleerde SC3 twee kleurstoffen toegevoegd, waarvan bekend is dat ze specifiek aan amyloidfibrillen binden (Kongorood en Thioflavine T). Inderdaad is gevonden dat geassembleerd SC3 deze kleurstoffen bindt (hoofdstuk 5). Uit de overeenkomsten (rijk aan β -sheet, vorming fibrillen, protofilamenten, binding aan de kleurstoffen) kunnen we concluderen dat rodlets amyloidfibrillen zijn. Echter, in tegenstelling tot andere amyloideiwitten, waarbij fibrilvorming een teken is van functieverlies, is de fibrilvorming door hydrofobines functioneel.

Thioflavine T bindt specifiek aan geassembleerd SC3 en dit gaat gepaard met een sterke toename in de fluorescentie. Dit effect is in hoofdstuk 5 gebruikt om de assemblage te bestuderen. Het blijkt dat SC3 alleen kan assembleren boven een kritische concentratie van 3,7 $\mu\text{g/ml}$. Dit suggereert een mechanisme waarbij bij deze concentratie eerst kernen van eiwitten moeten worden gevormd, die later kunnen groeien tot grotere fibrillen. De belangrijkste drijvende kracht voor de vorming van deze kernen lijkt de interactie tussen hydrofobe groepen te zijn en niet ladingsinteracties.

De studies naar de structuurveranderingen van hydrofobines hebben ons meer inzicht gegeven in het mechanisme van de zelf-assemblage. Deze kennis is van belang om het functioneren van deze eiwitten in schimmels te begrijpen, maar ook voor de ontwikkeling van toepassingen van hydrofobines.